

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Hana Horká

VÝVOJ VOLTAMETRICKÉ METODY PRO STANOVENÍ TEBUKONAZOLU

Development of voltammetric method for determination of
tebuconazole

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Jan Fischer, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Karolína Schwarzová, Ph.D.

Praha 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne

Tato bakalářská práce vznikla na katedře analytické chemie za finanční podpory GAČR (projekt 18-01710S).

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Janu Fischerovi, Ph.D. a své konzultantce Doc. RNDr. Karolině Schwarzové za cenné rady, věcné připomínky a vstřícnost při konzultacích a vypracování této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat za spolupráci RNDr. Júliovi Gajdárovi, Ph.D. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat mé rodině a blízkým přátelům, kteří mi poskytli podporu při studiu i psaní této práce.

Klíčová slova

borem dopovaná diamantová elektroda

elektroda ze skelného uhlíku

komplexace s kovy

triazolové pesticidy

visící rtuťová kapková elektroda

voltametrie

Key words

boron doped diamond electrode

complexation with metals

glassy carbon electrode

hanging mercury drop electrode

triazole pesticides

voltammetry

Abstrakt

Bylo provedeno elektrochemické zkoumání vlastností fungicidu tebukonazolu za použití voltametrických technik. Tebukonazol poskytoval pík v prostředí $0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ HNO}_3$ při měření technikou diferenční pulzní voltametrie na borem dopované diamantové elektrodě v okraji potenciálového okna ($+1700 \text{ mV}$), který nebyl zachytitelný na elektrodě ze skelného uhlíku. Sledováním volných měďnatých iontů v roztoku o koncentraci $1 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1} \text{ Cu(NO}_3)_2$ pomocí diferenční pulzní anodické rozpouštěcí voltametrie na visící rtuťové kapkové elektrodě v prostředí $0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ HNO}_3$ bylo možné nepřímo určit množství přítomného tebukonazolu v koncentračním rozmezí $2\text{--}10 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ s limitem stanovitelnosti $2,1 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$, protože vázal měďnaté ionty do komplexu. Optimalizované parametry ASDPV byly následovné: doba akumulace 60 s při -500 mV . Využití této metody pro stanovení tebukonazolu v reálné matrici říční vody poukázalo na nežádoucí interakce s touto matricí.

Abstract

Electrochemical investigation of the properties of the fungicide tebuconazole using voltammetric techniques has been demonstrated. Tebuconazole gave one peak on boron doped diamond electrode at the edge of the potential window (+1700 mV) in 0,01 mol l⁻¹ HNO₃, that was not detectable on the glassy carbon electrode. Monitoring of free copper ions at concentration 1 μmol l⁻¹ of Cu(NO₃)₂ in the presence of 0,01 mol l⁻¹ HNO₃ using anodic stripping differential pulse voltammetry on hanging mercury drop electrode resulted in a possibility to indirectly determine the amount of tebuconazole in the concentration range 2-10 μmol l⁻¹ with the limit of quantification 2,1 μmol l⁻¹, because of a formation of complexes with copper ions. The optimized ASDPV parameters were as follows: accumulation time 60 s at -500 mV. Practical application of this method for determination of tebuconazole in a real matrix of the river water showed unfavourable interaction with this matrix.

Seznam použitých zkratk a symbolů

A	absorbance
ASDPV	diferenční pulzní anodická rozpouštěcí voltametrie
BDDE	borem dopovaná diamantová elektroda
c	molární koncentrace [mol l^{-1}]
CV	cyklická voltametrie
DPV	diferenční pulzní voltametrie
E_p	potenciál píku [V]
GCE	elektroda ze skelného uhlíku
HMDE	visící rtuťová kapková elektroda
RSD	relativní směrodatná odchylka
I	elektrický proud [A]
λ	vlnová délka
$\epsilon_{221,4}$	absorpční koeficient při vlnové délce 221,4 nm

Obsah

1	Úvod	9
1.1	Cíl práce.....	9
2	Teoretická část	9
2.1	Fungicidy	9
2.2	Triazolové fungicidy.....	9
2.3	Tebukonazol.....	10
2.4	Fyzikálně-chemické vlastnosti tebukonazolu	10
2.5	Tebukonazol v životním prostředí	11
2.6	Analytické metody stanovení tebukonazolu	11
2.7	Elektrochemické vlastnosti tebukonazolu	12
2.8	Komplexy tebukonazolu s ionty mědi	12
3	Experimentální část.....	14
3.1	Použité chemikálie.....	14
3.2	Aparatura	14
3.3	Příprava roztoků.....	15
3.4	Postupy.....	16
3.5	Zpracování dat	16
4	Výsledky a diskuze	17
4.1	Voltametrie tebukonazolu na borem dopované diamantové elektrodě.....	17
4.2	Optimalizace podmínek pro stanovení mědi	18
4.3	Nepřímé stanovení tebukonazolu na elektrodě ze skelného uhlíku.....	18
4.4	Určení rozpustnosti tebukonazolu ve vodě	20
4.5	Voltametrie na visící rtuťové kapkové elektrodě.....	23
4.6	Detekce přítomnosti tebukonazolu v říční vodě	28
5	Závěr	30
6	Seznam použité literatury.....	31

1 Úvod

1.1 Cíl práce

Cílem této bakalářské práce je elektrochemické zkoumání vlastností tebukonazolu s využitím voltametrických technik, studium jeho komplexace s ionty mědi a možnosti jejího využití pro stanovení tohoto pesticidu.

2 Teoretická část

2.1 Fungicidy

Fungicidy jsou látky, které patří mezi pesticidy. Využívají se k hubení fytopatogenních hub, které škodí na kulturních rostlinách a látkách organického původu. Podle určení se fungicidy dělí na zemědělské a průmyslové (součást nátěrových hmot, k ošetření dřeva atd.). Z hlediska potřeb praxe se dělí na mořidla, postřiky, popraše a fungicidy pro ošetření půdy. Dále se dělí podle chemického složení na sloučeniny mědi, sloučeniny rtuti, sloučeniny ostatních těžkých kovů, sirné fungicidy, organické fungicidy a systémové fungicidy.[1]

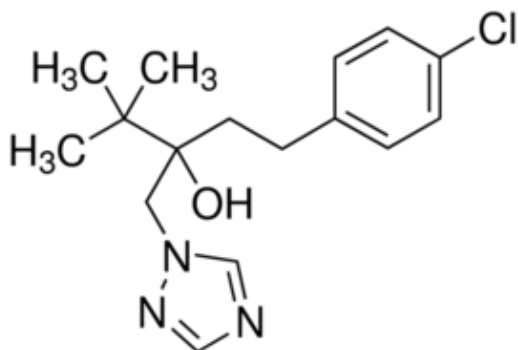
2.2 Triazolové fungicidy

Triazolové fungicidy patří mezi systémové fungicidy, které se používají k ničení plísňových chorob polních plodin. Systémové fungicidy proniknou do rostliny a jsou selektivně toxické pro konkrétní proces uvnitř fytopatogenní houby napadající rostlinu (např. syntéza DNA, RNA, dýchání, syntéza sterolů, tuků apod.).[2] Tyto triazolové sloučeniny inhibují biosyntézu klíčového steroidu hub, ergosterolu, což vede k narušení syntézy buněčné stěny.[3] Narušená biosyntéza sterolů způsobuje nestandardní růst hub a následně jejich smrt.[4]

Kromě toho se tyto sloučeniny používají také v terapeutických přípravcích (širokospektrá triazolová antimykotika [5]) a výrobcích pro osobní péči jako jsou šampony, dermální krémy, mýdla atd.[6, 7]

2.3 Tebukonazol

Tebukonazol, (RS)-1-(4-chlorofenyl)-4,4-dimethyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)-pentan-3-ol, je hojně využívaný triazolový fungicid (Obr.1). Používá se k ničení patogenních hub na rostlinách jako jsou ječmen, pšenice a arašídy.[8]



Obr.1: Struktura tebukonazolu

2.4 Fyzikálně-chemické vlastnosti tebukonazolu

Čistý tebukonazol je bezbarvý prášek bez zápachu. Rozpustnost tebukonazolu ve vodě je 36 mg kg^{-1} při 20°C a není závislá na pH.[9] Je velmi dobře rozpustný v organických rozpouštědlech. Rozdělovací koeficient oktanol/voda ($\log K_{ow}$) je při teplotách 10°C , 20°C i 30°C roven 3,5.[10] Další fyzikálně-chemické vlastnosti jsou uvedeny v tabulce 1.

Tab 1: Fyzikálně chemické vlastnosti tebukonazolu [10]

Sumární vzorec	$\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{ClN}_3\text{O}$
Hustota	$1,25 \text{ g cm}^{-3}$
Molární hmotnost	$307,82 \text{ g mol}^{-1}$
Teplota tání	106°C

2.5 Tebukonazol v životním prostředí

Tebukonazol se používá v emulzi jako postřik, což způsobuje, že kromě zasažení celých rostlin je též vysoká pravděpodobnost kontaminace půdy během postřiku nebo následně splachem při deštích. [1] Tebukonazol proto představuje risk pro půdní organismy, podzemní vodu, povrchovou vodu a vodní organismy. [1, 11]

Poločas rozkladu tebukonazolu v půdě je 9 až 263 dní [1], což může být ovlivněno různými fyzikálně chemickými vlastnostmi půd. Tebukonazol může interagovat s esenciálními prvky v půdě, jako je měď [12] či s nebezpečným kovem jako kadmium.[13] Toto může způsobit změnu v dostupnosti živin či mobilitu nebezpečných kovů.[13]

Lidská populace může být vystavena značným dávkám tebukonazolu po požití reziduí v potravinách, ve venkovských oblastech také inhalací během aplikace na plodiny nebo při styku s kůží s plodinami ošetřenými tímto fungicidem.[14]

Doposud není zjištěn přesný způsob biotransformace tebukonazolu u lidí [14] a jeho využívání tak může představovat riziko pro lidské zdraví.[1] Tebukonazol byl Agenturou pro ochranu životního prostředí klasifikován jako potenciální karcinogen se střední akutní toxicitou.[14] Ve vysokých dávkách způsobuje malformace u zvířat in vitro a in vivo [15], proto ho Evropský úřad pro bezpečnost potravin zařadil na seznam možných teratogenů. [14] Předchozí studie uvádějí, že expozice tebukonazolu může působit hepatotoxické a genotoxické účinky. Tebukonazol také může způsobit narušení endokrinní činnosti štítné žlázy.[16]

2.6 Analytické metody stanovení tebukonazolu

Moderní metodou pro stanovení triazolových fungicidů je spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií a elektrosprejovou ionizací. Této metody bylo využito pro kvalitativní a kvantitativní stanovení enantiomerů tebuconazolu a tetraconazolu. Metoda má vysokou selektivitu a citlivost s limity kvantifikace pro enantiomery $0,008 \mu\text{mol l}^{-1}$. [17, 18]

V dalších pracích se rezidua tebukonazolu monitorují pomocí plynové chromatografie s dusíko-fosforovým detektorem (GC-NPD) s mezí stanovitelnosti $0,032 \mu\text{mol l}^{-1}$ či pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní

detekcí (HPLC-MS-MS) s mezí stanovitelnosti $0,016 \mu\text{mol l}^{-1}$. Často je také využíváno plynové chromatografie s hmotnostním spektrometrem (GC-MS) s mezí stanovitelnosti $0,002 \mu\text{mol l}^{-1}$. [19]

Další možností stanovení tebukonazolu je na měděné amalgámové elektrodě, kde se využívá vysoké afinity tebukonazolu k iontům mědi. [1]

2.7 Elektrochemické vlastnosti tebukonazolu

Voltametrické chování tebukonazolu bylo studováno na borem dopované diamantové elektrodě technikami cyklické voltametrie a diferenční pulzní voltametrie v $0,1 \text{ mol l}^{-1} \text{ HNO}_3$. Bylo zjištěno, že tebukonazol poskytuje jeden oxidační signál při potenciálu $+1700 \text{ mV}$. [20]

V další studii se autoři věnují voltametrickému chování tebukonazolu za použití meniskem modifikované měděné pevné amalgámové elektrody, kde bylo využito tvorby komplexu tebukonazolu s mědí. Nejvýraznější a nejlepší reprodukovatelné katodické signály byly zaznamenány technikou CV v prostředí Britton-Robinsonova pufru/methanolu (1:1, v/v) při pH 6,4. Tebukonazol v komplexu s ionty mědi poskytoval redukční (katodický) signál při potenciálu -206 mV . [21]

Tebukonazol byl podroben zkoumání na zlaté elektrodě technikou cyklické a square wave voltametrie v prostředí $0,05 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaHCO}_3$. Bylo prokázáno, že zlatá elektroda působí jako katalyzátor při oxidaci tebukonazolu díky tvorbě AuOH na povrchu elektrody. Při CV (rychlost skenu 50 mV s^{-1}) tebukonazol poskytoval oxidační signál při $+200 \text{ mV}$. Anodickou adsorpční square wave voltametrií za použití akumulčního času 10s při potenciálu $0,0 \text{ V}$ byl získán oxidační pík tebukonazolu při potenciálu $+500 \text{ mV}$. Limit detekce této metody byl $0,045 \mu\text{mol l}^{-1}$. [22]

2.8 Komplexy tebukonazolu s ionty mědi

Triazolový kruh ve své struktuře předurčuje potenciální schopnost tebukonazolu (i dalších triazolů) vytvářet komplexy s kationty. [23]

Bylo prokázáno, že triazolové fungicidy mohou tvořit komplexy s ionty mědi a měnit tak jejich chování v životním prostředí, jejich akumulaci v půdě či degradaci. [6] Složení i typ půdy velmi ovlivní, jaké komplexy tebukonazolu budou v půdě převažovat. [13]

Z předchozích studií je zjištěno, že tebukonazol s ionty mědi v roztoku tvoří pouze komplex $[\text{Cu}(\text{NO}_3)(\text{Teb})_2]^+$. Stabilita tohoto komplexu je vysoká, což dokazuje jeho konstanta stability $\beta=7,6$. [1, 11, 13]

3 Experimentální část

3.1 Použité chemikálie

Všechny použité chemikálie byly analytické čistoty. Tebukonazol (analytický standard) (CAS 107534-96-3, Sigma-Aldrich). $\text{Cu}(\text{Cl})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Lachema), $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ (Lach-ner), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Lach-ner), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Lach-ner), HNO_3 (65%, Lach-ner), H_3PO_4 (85%, Lach-ner), NaOH (Penta), HCl (36%, Lach-ner), acetonitril (Sigma-Aldrich).

K přípravě roztoků byla použita deionizovaná voda (rezistivita 18,2 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$, produkční systém Milli-Q Plus, Millipore, USA). Při studiu stanovení tebukonazolu v říční vodě byla použita voda z řeky Jihlavy (místo odběru: Jihlava, datum odběru: 19. 7. 2020).

3.2 Aparatura

Voltametrická měření na pevných pracovních elektrodách byla prováděna na přístroji Eco-Tribo Polarograf se softwarem PolarPro, verze 5.1, firmy Polaro-Sensors, Praha, ČR. Měření probíhala v tříelektrodovém zapojení. Jako pracovní elektroda byla použita elektroda ze skelného uhlíku (GCE) (průměr disku 2 mm, model 6.1204.600 Metrohm, Švýcarsko) a borem dopovaná diamantová elektroda (BDDE) (průměr disku 3 mm, model M-BDD-3, BioLogic, Francie). Jako referentní elektroda byla použita argentochloridová elektroda (3 mol l^{-1} KCl, model ETP-CZ-R00209 Eco-Trend Plus, Praha, ČR) a jako pomocná byla použita platinová drátková elektroda (Elektrochemické detektory, Turnov, ČR).

Voltametrie na visící rtuťové kapkové elektrodě byla provedena na přístroji Metrohm 663 VA Stand s potenciostatem $\mu\text{AUTOLAB TYPE III}$ a softwarem NOVA 2.1 od firmy Metrohm. Jako referentní elektroda byla použita argentochloridová elektroda (3 mol l^{-1} KCl, model 6.0728.020 se solným můstkem model 6.1245.010) a jako pomocná elektroda byl použit válec ze skelného uhlíku (model 6.1247.000); vše od firmy Metrohm.

Spektrofotometrické měření bylo prováděno na spektrofotometru Agilent 8453 v křemenné kyvetě o tloušťce 10 mm.

Přesná hodnota pH byla měřena pomocí digitálního pH-metru Jenway 4330 (Jenway, Essen, Velká Británie) s kombinovanou skleněnou elektrodou. Kalibrace pH metru byla prováděna pomocí standardních roztoků pufrů za laboratorní teploty.

Všechny látky byly naváženy na analytických vahách od firmy Sartorius, Sartalex, Ústí nad Labem, ČR.

3.3 Příprava roztoků

Pro optimalizaci podmínek pro stanovení měďnatých iontů v roztoku byl použit fosfátový pufr o koncentraci $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ a pH 7,2. Roztok byl připraven smíšením 4,463 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 1,153 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ve 250ml odměrné baňce a doplněním deionizovanou vodou po rysku.

Dále byl použit fosfátový pufr o koncentraci $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ o pH 2,3, který byl připraven smícháním 6,7 ml 85% kyseliny fosforečné s 55 ml roztoku hydroxidu sodného o koncentraci 1 mol l^{-1} v 700 ml deionizované vody. Následně bylo pH upraveno pomocí 1 mol l^{-1} H_3PO_4 nebo NaOH a roztok byl doplněn v litrové odměrné baňce po risku.

Zásobní roztoky $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ a CuCl_2 o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ byly připraveny rozpuštěním přesně naváženého množství látky v deionizované vodě. Zásobní roztoky tebukonazolu v acetonitrilu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ a v $0,01 \text{ mol l}^{-1}$ kyselině dusičné (připravené z deionizované a říční vody) o koncentraci $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ byly připraveny rozpuštěním přesně naváženého množství látky v daných rozpouštědlech. Zásobní roztok $0,01 \text{ mol l}^{-1}$ HNO_3 byl připraven z deionizované a říční vody.

Roztoky pro nepřímá voltametrická stanovení tebukonazolu byly připraveny odměřením vypočítaného objemu zásobního roztoku tebukonazolu a roztoku $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ a následně byl roztok doplněn v odměrné baňce základním elektrolytem $0,01 \text{ mol l}^{-1}$ HNO_3 na objem 10 ml. Roztoky pro detekci tebukonazolu v reálné matrici byly připraveny smíšením daného objemu zásobního roztoku tebukonazolu připraveného z říční vody ($c = 4 \mu\text{mol l}^{-1}$) a roztoku $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ ($1 \mu\text{mol l}^{-1}$). Takto vzniklý roztok byl do 10 ml doplněn roztokem $0,01 \text{ mol l}^{-1}$ HNO_3 připravené z říční vody.

3.4 Postupy

U pevných elektrod (GCE a BDDE) byl vždy před měřením vkládán čistící pulz +800 mV na dobu 30s v míchaném roztoku. Při DPV byla použita výška pulzu –50 mV, šířka pulzu 100 ms, vzorkovací perioda 20 ms a rychlost skenu 20 mV s⁻¹.

Při ASDPV byla použita doba akumulace 60s při –500 mV s mícháním roztoku následována klidovou dobou 5 s před DPV skenem. Výška pulzu při DPV byla 50 mV, šířka pulzu 80 ms a rychlost skenu 20 mV s⁻¹.

Elektroda ze skelného uhlíku byla před každým měřením leštěna suspenzí aluminy po dobu 5 minut. Všechny roztoky byly před prvním měřením 5 minut probublávány dusíkem pro zbavení kyslíku, před každým dalším měřením byly roztoky probublávány 1 minutu.

3.5 Zpracování dat

Všechna měření byla provedena v pěti opakováních. K vyhodnocení naměřených dat byly použity počítačové programy OriginPro 2015 od firmy OriginLab Corporation (Northampton, MA, USA) a Microsoft Excel od firmy Microsoft Corporation (USA).

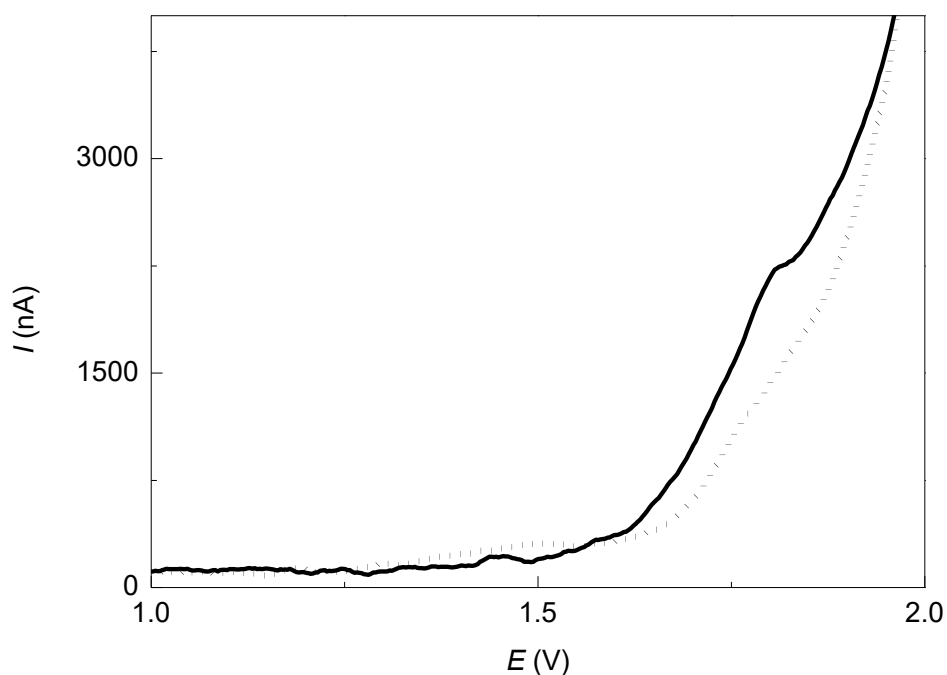
Chybové intervaly parametrů lineárních závislostí odpovídají směrodatným odchylkám vypočítaným programem OriginPro 2015. Mez stanovitelnosti LOQ byla pro nejnížší sledovanou koncentraci vypočítána z desetinásobku směrodatné odchylky a následně vydělena směrnici kalibrační křivky.

4 Výsledky a diskuze

4.1 Voltametrie tebukonazolu na borem dopované diamantové elektrodě

Na základě dříve publikované práce [20] byla provedena oxidace tebukonazolu na BDDE technikou DPV v roztoku $0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ HNO}_3$, zobrazen na Obr.1. Byl nalezen jeden oxidační pík tebukonazolu při velmi kladném potenciálu $+1700 \text{ mV}$. Oxidace byla také testována technikou cyklická voltametrie (od 0 mV do 1900 mV , rychlost skenu 50 mV s^{-1}), ale nebyla pozorována žádná odezva.

Obdobná měření byla zopakována na GCE, kde analyty mívají signál při nižších potenciálech [24], ale ani v tomto případě nebyl získán oxidační pík tebukonazolu. Ve vodném prostředí bylo potenciálové okno příliš úzké na to, aby bylo možné zachytit takto nízkou koncentraci tebukonazolu. Z toho vyplývá, že přímé voltametrické stanovení tebukonazolu ve vodném prostředí není možné vyvinout s dostatečnou citlivostí a je třeba jiného přístupu.



Obr.2: DP voltamogram $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ tebukonazolu v $0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ HNO}_3$ měřený na BDDE. Základní elektrolyt je vyznačen tečkovanou čarou.

4.2 Optimalizace podmínek pro stanovení mědi

Jak je uvedeno v kapitole 2.8, tebukonazol by měl tvořit komplex s volnými ionty Cu^{2+} , který bude možno využít k vývoji metody jeho stanovení. Z tohoto důvodu byly hledány optimální podmínky pro stanovení měďnatých iontů různými voltametrickými technikami jako DPV a ASDPV na elektrodě ze skelného uhlíku. Pro nalezení optimálních podmínek byl sledován signál roztoků dvou měďnatých solí: CuCl_2 a $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ v prostředí fosfátového pufru o pH 7,2 a 2,3 (prostředí převzata z [25]). Ani v jedné z kombinací těchto roztoků solí a pufrů nebyl získán stabilní signál.

Následně byla modifikována dříve popsaná ASDPV metoda pro stanovení kovů ve vodných roztocích (doba akumulace 60s při -500mV) v $0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ HNO}_3$. [26] Vzhledem ke špatné opakovatelnosti signálu se kalibrační závislost Cu^{2+} v $0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ HNO}_3$ na GCE nepodařilo naměřit.

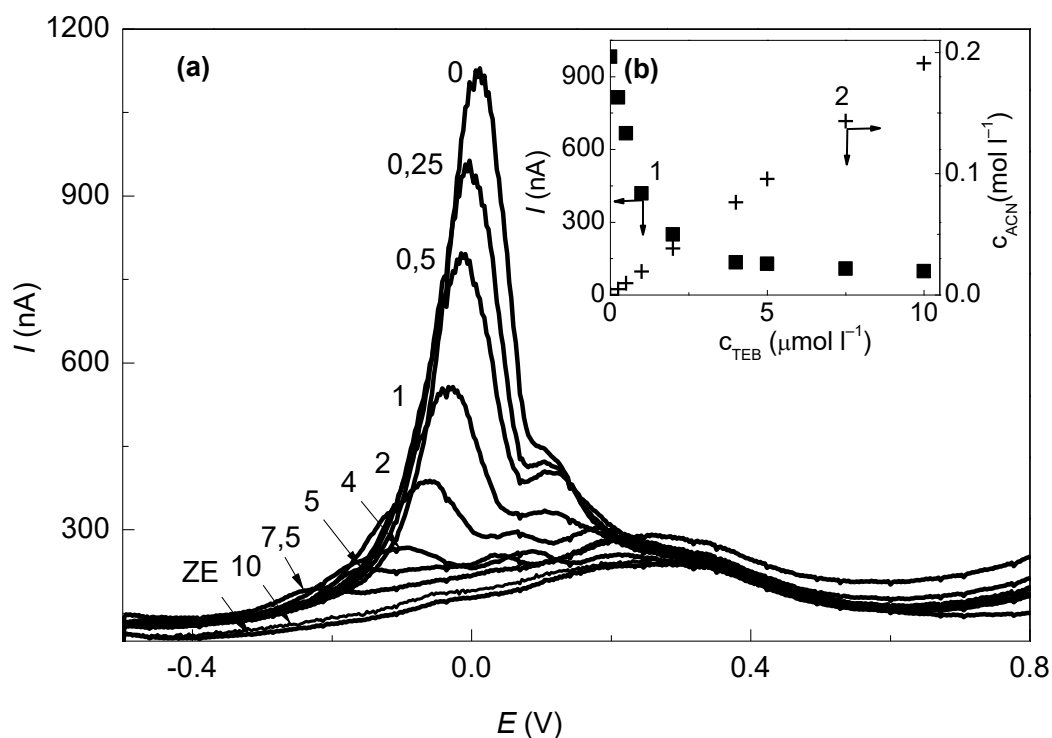
Bylo zjištěno, že loužení elektrody v 1 mol l^{-1} kyselině dusičné po dobu několik hodin zlepšuje opakovatelnost měření a nalezené podmínky mohly být použity pro další experimenty.

4.3 Nepřímé stanovení tebukonazolu na elektrodě ze skelného uhlíku

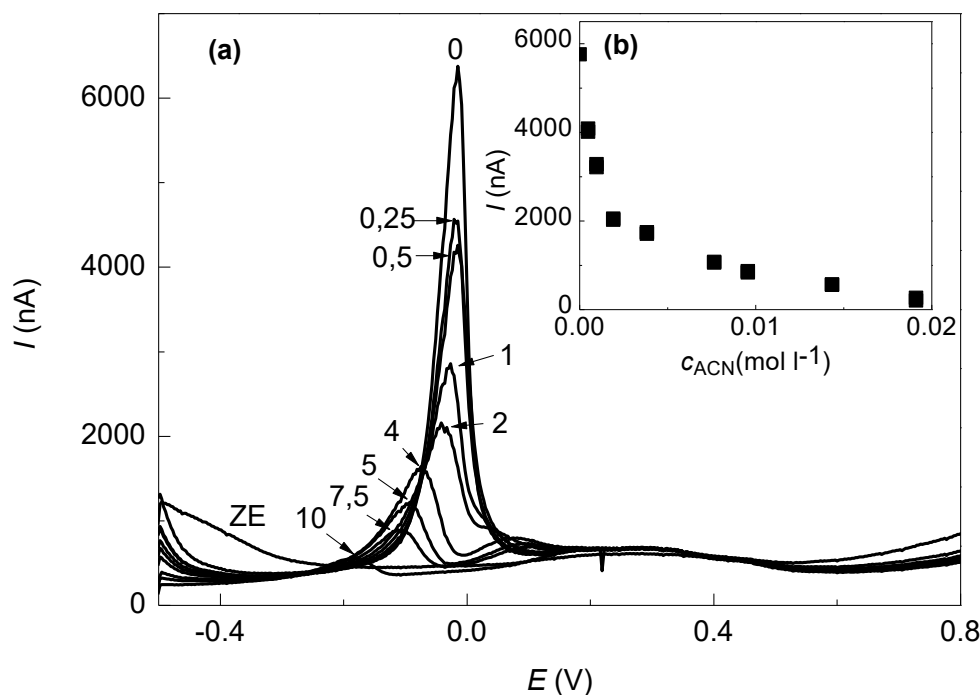
Optimalizované podmínky umožnily studovat závislost signálu volných Cu^{2+} v roztoku na koncentraci tebukonazolu. Na elektrodě ze skelného uhlíku byla provedena ASDPV (doba akumulace 60s při potenciálu -500 mV) Cu^{2+} z $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ o koncentraci $10 \mu\text{mol l}^{-1}$ v $0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ HNO}_3$ s přidavky tebukonazolu rozpuštěného v acetonitrilu o objemech 0; 2,5; 2,5; 5; 10; 20; 10; 25 a 25 μl . Výsledné koncentrace těchto přidavek tebukonazolu byly 0; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 5; 7,5 a $10 \mu\text{mol l}^{-1}$. Na obr. 3 jsou ukázány poklesy signálu Cu^{2+} po jednotlivých přidavcích tebukonazolu.

Studie [27] udává, že také acetonitril tvoří s ionty mědi komplexy typu $\text{Cu}^+(\text{CH}_3\text{CN})_x$, $x=1-5$. Proto byla proměřena závislost acetonitrilu na poklesu signálu píku Cu^{2+} se stejnými přidavky acetonitrilu bez tebukonazolu (obr.4), což odpovídá rozsahu koncentrací $0,48 \cdot 10^{-3}$ až $0,19 \text{ mol l}^{-1}$ acetonitrilu v roztoku.

Bylo potvrzeno, že pokles signálu Cu^{2+} je způsoben přítomností acetonitrilu, proto bylo nutné zvolit jiné rozpouštědlo. Byla zvolena deionizovaná voda, ve které by měly být rozpustné nízké koncentrace tebukonazolu.



Obr. 3: **(a)** ASDP voltamogramy $10 \mu\text{mol l}^{-1} \text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ v $0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{HNO}_3$ s přidavky tebukonazolu rozpouštěného v acetonitrilu, měřené na GCE. Koncentrace tebukonazolu v $\mu\text{mol l}^{-1}$ je vyznačena u každé křivky. **(b)** 1) Kalibrační závislost proudu píku $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1} \text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ na koncentraci tebukonazolu (závislost 1), 2) aktuální koncentrace acetonitrilu v jednotlivých roztocích, koncentrace jsou vyneseny na pravé ose Y (závislost 2).



Obr.4: **(a)** ASDP voltamogramy $10 \mu\text{mol l}^{-1} \text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ v $0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{HNO}_3$ s přidavky acetonitrilu měřené na GCE. Koncentrace acetonitrilu v $\mu\text{mol l}^{-1}$ je vyznačena u každé křivky. **(b)** Závislost proudu píku $10 \mu\text{mol l}^{-1} \text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ na koncentraci acetonitrilu.

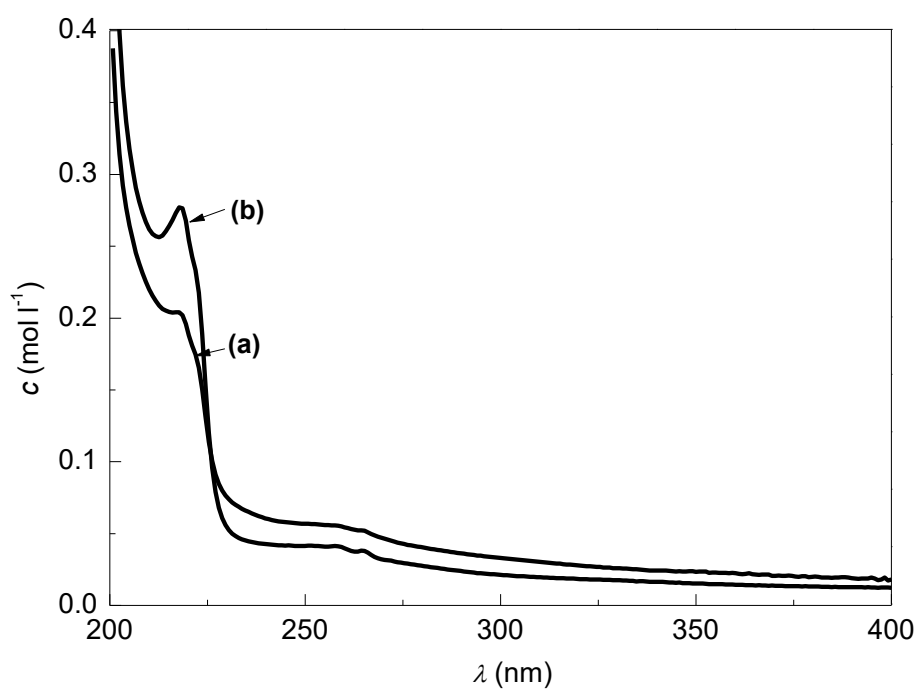
4.4 Určení rozpustnosti tebukonazolu ve vodě

V literatuře [10] uváděná rozpustnost tebukonazolu ve vodě je 36 mg l^{-1} , což odpovídá $1,17 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. Při této koncentraci se tebukonazol nepodařilo zcela rozpustit, proto byl roztok naředěn na koncentraci $1 \cdot 10^{-5}$ a $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ v deionizované vodě, a byla naměřena UV-VIS spektra těchto roztoků, viz Obr. 5.

Z Lambert-Beerova zákona byly pomocí známého absorpčního koeficientu ($\epsilon_{221,4} = 11980 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [9] a naměřené absorbance vypočítány koncentrace roztoků. Hodnoty zjištěných koncentrací jsou uvedeny v tabulce 2. Z vypočtených koncentrací vyplývá, že tebukonazol v roztoku o koncentraci $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ byl zcela rozpuštěn, v roztoku o koncentraci $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ nikoli.

Vzhledem k velmi nízké rozpustnosti a tím i nízké koncentraci roztoku, musel být zásobní roztok o koncentraci $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ připraven v základním elektrolytu, tedy v $0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ HNO}_3$.

Rozpustnost tebukonazolu není na pH závislá, proto by okyselení roztoku nemělo mít žádný vliv.[1] Z důvodu nedostatečné citlivosti a opakovatelnosti měření bylo upuštěno od měření na GCE a přešlo se na HMDE, u které je povrch obnovován před každým měřením.



Obr.5: Spektrum (a) $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ a (b) $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ tebukonazolu rozpuštěného ve vodě. Šířka kyvety byla 1 cm.

Tabulka 2: Porovnání připravených a zjištěných koncentrací tebukonazolu rozpuštěného ve vodě pomocí UV-VIS spektrometrie. Uvedeny jsou dvě opakované měření se dvěma roztoky v křemenné kyvetě o šířce 1 cm.

Připravená koncentrace (mol l⁻¹)	Absorbance při 221,4 nm	Zjištěná koncentrace (mol l⁻¹)
2,00·10 ⁻⁵	0,2318	1,94·10 ⁻⁵
	0,2326	1,94·10 ⁻⁵
1,00·10 ⁻⁵	0,1211	1,01·10 ⁻⁵
	0,1203	1,00·10 ⁻⁵

4.5 Voltametrie na visící rtuťové kapkové elektrodě

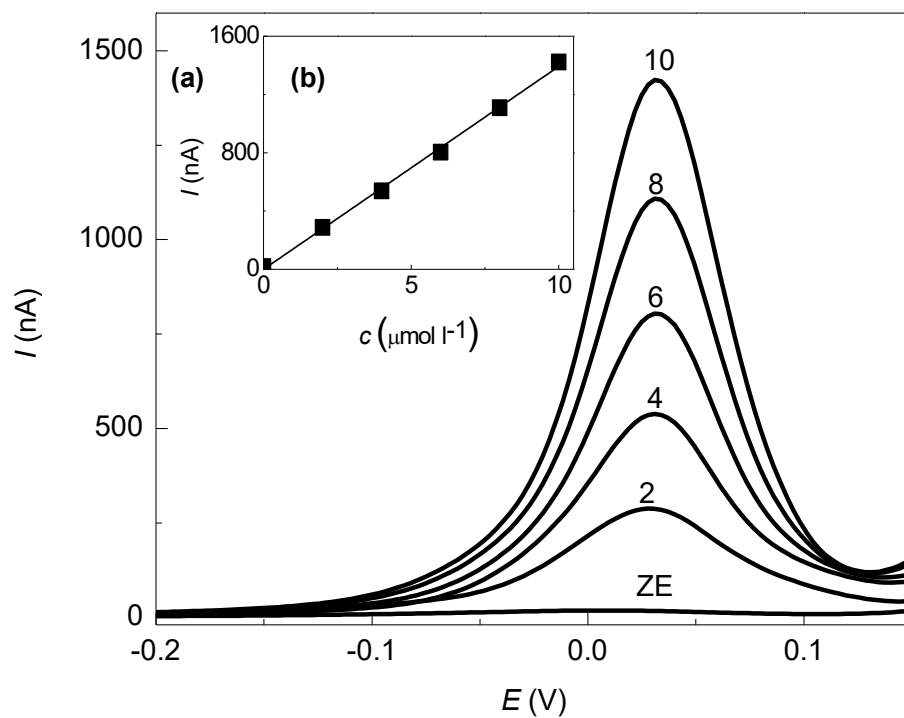
Opakovatelnost měření na HMDE metodou ASDPV byla ověřena na roztoku o koncentraci Cu^{2+} $1 \mu\text{mol l}^{-1}$. Byl pozorován prudký pokles anodického signálu během pěti měření bez obnovy povrchu HMDE ($\text{RSD} = 18,5 \%$). V dalším průběhu práce se vyhodnocoval vždy jen první pík po obnovení povrchu. V tomto případě bylo dosaženo $\text{RSD} = 1,5 \%$ pro 3 první měření.

Za těchto podmínek byla naměřena kalibrační křivka Cu^{2+} roztoku $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ v $0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ HNO}_3$ v rozsahu koncentrací $2\text{--}10 \mu\text{mol l}^{-1}$, která je vynesena na grafu (obr. 6). V tabulce 3 jsou zaznamenány parametry zjištěné lineární kalibrační závislosti.

Následně bylo provedeno nepřímé stanovení tebukonazolu na HMDE. Na obr.7 jsou ASDP voltamogramy $10 \mu\text{mol l}^{-1} \text{ Cu}(\text{NO}_3)_2$ v $0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ HNO}_3$ s přídavky tebukonazolu o výsledných koncentracích $2\text{--}10 \mu\text{mol l}^{-1}$. Byly pozorovány jen mírné poklesy signálu Cu^{2+} , proto se dále pracovalo s roztokem $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, který měl o řád nižší koncentraci.

K ověření, zda je koncentrační závislost Cu^{2+} lineární i v nižším koncentračním řádu a tedy použitelná k nepřímému stanovení tebukonazolu, byla naměřena kalibrační křivka $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ v $0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ HNO}_3$ v rozsahu koncentrací $0,2\text{--}1 \mu\text{mol l}^{-1}$; viz. Obr. 8 a tabulka 4. Z výsledků vyplývá, že metoda je dostatečně citlivá i pro stanovení Cu^{2+} v tomto koncentračním rozsahu. Je patrné, že k nižším koncentracím nebylo možné jít z důvodu kolidujícího píku v základním elektrolytu, který je pravděpodobně způsoben nedostatečným oplachem cely a elektrod při změně měřených roztoků.

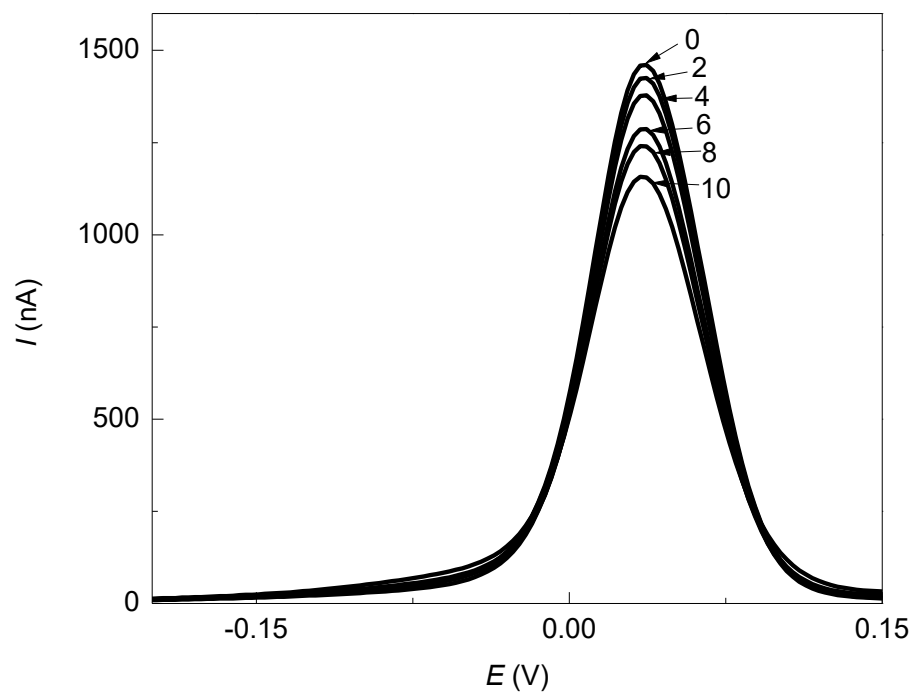
Dále bylo provedeno nepřímé stanovení tebukonazolu. Na obrázku 9 jsou zaznamenány ASDP voltamogramy $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ o koncentraci $1 \mu\text{mol l}^{-1}$ v $0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ HNO}_3$ v přítomnosti tebukonazolu v koncentračním rozsahu $2\text{--}10 \mu\text{mol l}^{-1}$. Ze získaných dat bylo prokázáno, že poklesy signálu Cu^{2+} jsou přímo úměrné koncentraci tebukonazolu v roztoku. V tabulce 5 jsou zaznamenány parametry kalibrační přímky.



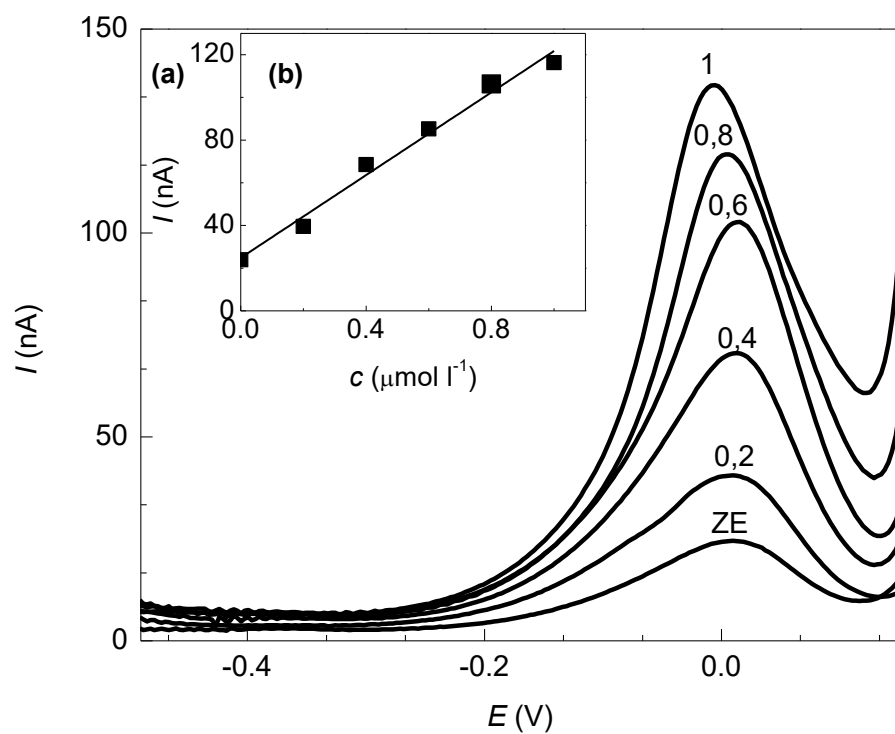
Obr.6: ASDP voltamogramy $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ v $0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ HNO}_3$ naměřené na HMDE, graf (a):. koncentrace $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ v $\mu\text{mol l}^{-1}$ jsou uvedeny u každé křivky. Vložený graf (b) odpovídá závislosti proudu píku na koncentraci.

Tabulka 3: Parametry kalibrační přímky $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ v $0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ HNO}_3$. Měřeno technikou ASDPV na HMDE.

Koncentrace ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	Směrnice ($\text{nA} \cdot \mu\text{mol l}^{-1}$)	Úsek (nA)	Korelační koeficient
2-10	$139,3 \pm 3,1$	$-0,08 \pm 18,8$	0,9901



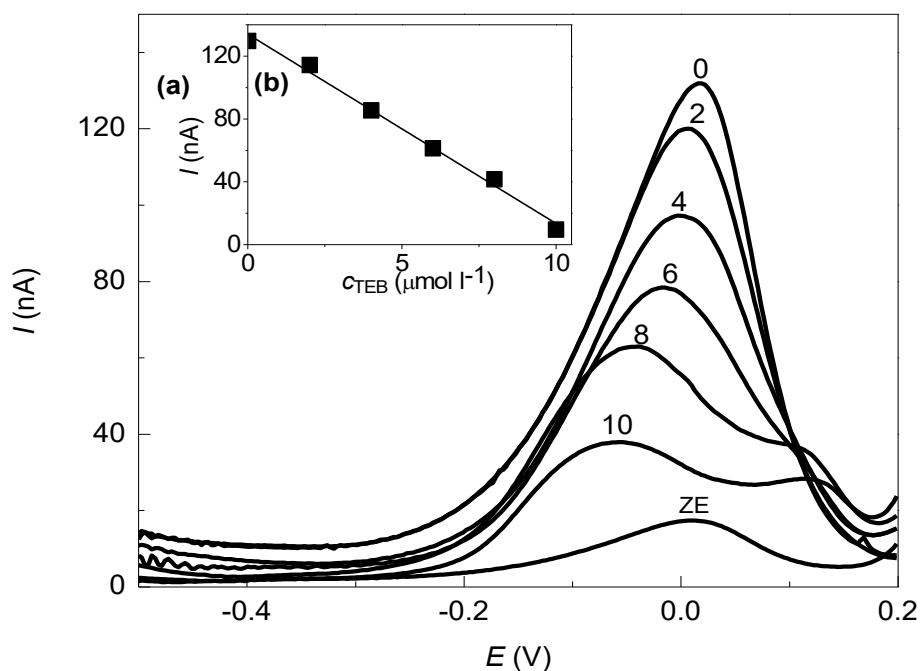
Obr.7: ASDP voltamogramy $10 \mu\text{mol l}^{-1} \text{ Cu}(\text{NO}_3)_2$ v $0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ HNO}_3$ s přidavky tebukonazolu rozpuštěného v $0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ HNO}_3$. Měřeno na HMDE. Výsledná koncentrace tebukonazolu v $\mu\text{mol l}^{-1}$ je vyznačena u jednotlivých křivek.



Obr.8: **(a)** ASDP voltamogramy $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ v $0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ HNO}_3$ na HMDE. Koncentrace $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ v $\mu\text{mol l}^{-1}$ jsou uvedeny u každé křivky, **(b)** kalibrační závislost proudu píku na koncentraci $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ v $0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ HNO}_3$.

Tabulka 4: Parametry kalibrační přímky $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ v $0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ HNO}_3$. Měřeno technikou ASDPV na HMDE.

Koncentrace $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	Směrnice ($\text{nA} \cdot \text{l} \cdot \mu\text{mol l}^{-1}$)	Úsek (nA)	Korelační koeficient	LOQ $\mu\text{mol l}^{-1}$
0,2-1	$97,0 \pm 5,9$	$24,8 \pm 3,6$	0,9927	0,34



Obr.9: **(a)** ASDP voltamogramy $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ o koncentraci $1 \mu\text{mol l}^{-1}$ v $0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ HNO}_3$ s přidavky tebukonazolu rozpuštěného v $0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ HNO}_3$ měřené na HMDE. Koncentrace tebukonazolu v $\mu\text{mol l}^{-1}$ je vyznačena u každé křivky, **(b)** závislost signálu $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ o koncentraci $1 \mu\text{mol l}^{-1}$ v $0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ HNO}_3$ na koncentraci tebukonazolu rozpuštěného v $0,01 \text{ M HNO}_3$. Měřeno ASDPV na HMDE.

Tabulka 5: Parametry kalibrační přímky $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ v $0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ HNO}_3$ s přidavky tebukonazolu. Měřeno technikou ASDPV na HMDE.

Koncentrace tebukonazolu ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	Směrnice ($\text{nA} \cdot \text{l} \cdot \mu\text{mol}^{-1}$)	Úsek (nA)	Korelační koeficient	LOQ $\mu\text{mol l}^{-1}$
2-10	$-94,2 \pm 3,9$	$135,2 \pm 2,4$	0,9913	2,1

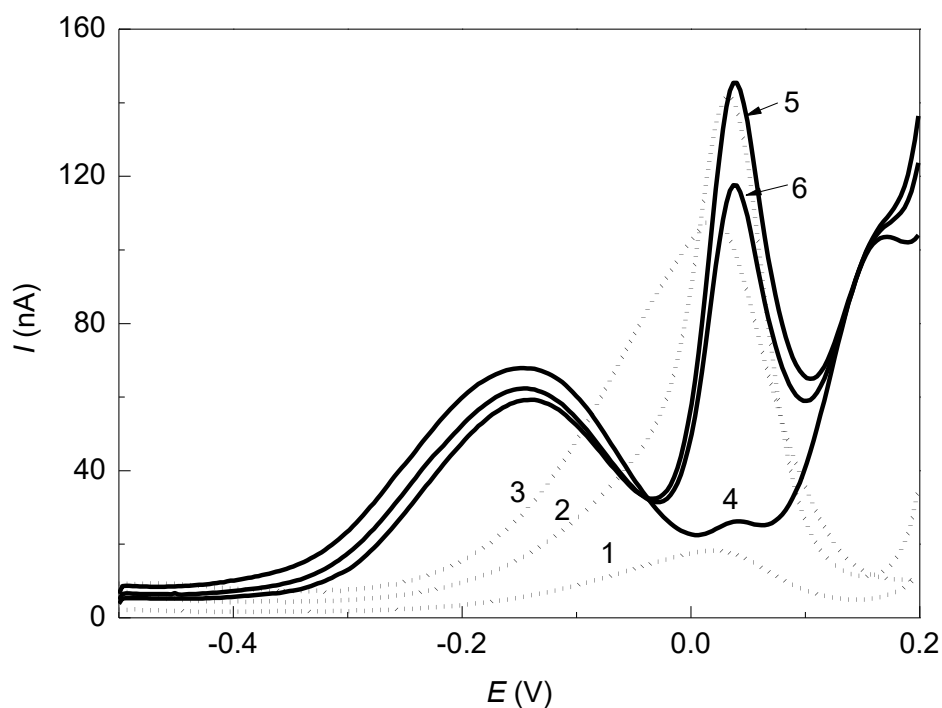
4.6 Detekce přítomnosti tebukonazolu v říční vodě

Ke zjištění, zda je navrženou metodu možné přímo využít i v jednoduchých reálných matricích, byl proveden jednoduchý experiment metodou ASDP voltametrie na HMDE. Při tomto experimentu byly porovnány signály Cu^{2+} a jejich pokles způsobený jedním přídatkem tebukonazolu v deionizované a říční vodě.

V deionizované vodě byl naměřen nejprve základní elektrolyt (křivka 1 na obr. 10), dále po přidavku $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ o výsledné koncentraci $1 \mu\text{mol l}^{-1}$ je patrný pík Cu^{2+} při 0,0 V (křivka 2). Po přidání roztoku tebukonazolu o výsledné koncentraci $4 \mu\text{mol l}^{-1}$ (křivka 3) byl pozorován pokles signálu píku Cu^{2+} . Hodnoty píků jsou uvedeny v tabulce 7.

Pro detekci tebukonazolu byl nejdříve naměřen základní elektrolyt připraven z říční vody (křivka 4), po přidavku $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ o výsledné koncentraci $1 \mu\text{mol l}^{-1}$ je patrný pík při 0,0V (křivka 5). Po přidavku tebukonazolu o výsledné koncentraci $4 \mu\text{mol l}^{-1}$ (křivka 6) došlo k poklesu píku měďnatých iontů. Hodnoty signálů jsou uvedeny v tabulce 7.

Je zřejmé, že signál $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ o koncentraci $1 \mu\text{mol l}^{-1}$ v matrici říční vody byl nižší, než v prostředí deionizované vody. To znamená, že měďnaté ionty pravděpodobně interagují s látkami přítomnými v říční vodě. Dále experiment prokázal, že pokles signálu Cu^{2+} po přidavku tebukonazolu v deionizované vodě je 38,5 nA, zatímco v říční vodě pouze 20,5 nA. Pokles signálu v říční vodě je výrazně menší, z čeho vyplývá, že matrice měla vliv i na samotnou tvorbu komplexu Cu^{2+} a tebukonazolu. Pro využití této metody v praxi by se tedy nejdříve musela použít předúprava vzorku pro izolaci tebukonazolu od rušící matrice.



Obr.10: ASDP voltamogramy v 0,01 mol l⁻¹ HNO₃ naměřené na HMDE připravené z deionizované (tečkované křivky 1–3) a z říční vody (4–6), s přísavky Cu(NO₃)₂ o výsledné koncentraci 1 μmol l⁻¹ (křivka 2, 5) a tebukonazolu o výsledné koncentraci 4 μmol l⁻¹ (křivka 3, 6).

Tabulka 7: Velikosti signálu Cu²⁺ v jednotlivých roztocích v 0,01 mol l⁻¹ HNO₃ podle Obr. 10. Měřeno technikou ASDPV (doba akumulace 60s při potenciálu -500mV) na HMDE.

Roztok	výška píku Cu ²⁺ (nA)
Cu ²⁺ (c=1 μmol l ⁻¹) v deionizované vodě	137,9
Cu ²⁺ (c=1 μmol l ⁻¹) a tebukonazol (c=4 μmol l ⁻¹) v deionizované vodě	99,4
Cu ²⁺ (c=1 μmol l ⁻¹) v říční vodě	80,3
Cu ²⁺ (c=1 μmol l ⁻¹) a tebukonazol (c=4 μmol l ⁻¹) v říční vodě	59,8

5 Závěr

Pomocí voltametrických technik byly zkoumány vlastnosti tebukonazolu a jeho komplexace s ionty mědi. Byla provedena DPV tebukonazolu na BDDE, kde analyt poskytoval oxidační pík při velmi kladném potenciálu 1,7 V. Na GCE tebukonazol oxidační pík neposkytoval. Vzhledem k neuspokojivým výsledkům při přímém voltametrickém stanovení se přešlo na nepřímé stanovení, kdy byl sledován pokles signálu volných měďnatých iontů v roztoku po přidavcích tebukonazolu.

Následně byla provedena optimalizace stanovení $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ pomocí ASDPV. Na GCE nebylo dosaženo dostatečné citlivosti a opakovatelnosti měření, proto bylo za optimální zvoleno stanovení na HMDE v prostředí $0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ HNO}_3$.

Bylo ověřeno, že tebukonazol tvoří komplexy s měďnatými ionty, které pak již nejsou elektrochemicky aktivní. Byly nalezeny optimální podmínky pro sledování poklesu signálu Cu^{2+} způsobeného komplexací měďnatých iontů s tebukonazolem. Nejvhodnějším prostředím pro analytické stanovení bylo prostředí $1 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1} \text{ Cu}(\text{NO}_3)_2$ v $0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ HNO}_3$, ve kterém byla výška píku Cu^{2+} nepřímo úměrná koncentraci tebukonazolu v rozsahu $2\text{-}10 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$.

Při testování metody v matrici říční vody bylo zjištěno, že měďnaté ionty interagují s látkami přítomnými v matrici a tyto látky měli vliv i na tvorbu komplexu měďnatých iontů s tebukonazolem. Pro další využití této metody v praxi by se muselo využít předúpravy vzorku pro izolaci tebukonazolu od rušících složek matrice.

6 Seznam použité literatury

1. Norková R.: *Studium komplexů tebukonazolu s ionty kovů* Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, 2012.
2. Edgington L., Martin R., Bruin G., Parsons I.: *Systemic fungicides: A perspective after 10 years*. Plant disease 64, 19-23 (1980).
3. Tomlin C. D. S.: *The Pesticide Manual, 12th ed.* Farnham, Surrey, UK 2000.
4. Zarn J. A., Brüschweiler B. J., Schlatter J. R.: *Azole fungicides affect mammalian steroidogenesis by inhibiting sterol 14 alpha-demethylase and aromatase*. . Environmental health perspectives 111, 255-263 (2003).
5. Schiller D. S., Fung H. B.: *Posaconazole: an extended-spectrum triazole antifungal agent*. Clinical therapeutics 29, 1862-1886 (2007).
6. Dytrtová J. J., Bělonožníková K., Jakl M., Ryšlavá H.: *Triazoles and aromatase: The impact of copper cocktails*. Environmental Pollution 266, part 1, 115201 (2020).
7. Assress H. A., Nyoni H., Mamba B. B., Msagati T. A.: *Occurrence and risk assessment of azole antifungal drugs in water and wastewater*. Ecotoxicology and environmental safety 187, 109868 (2020).
8. Khalil N. H. H. B., Huat T. G., v k.: *Agricultural Chemistry* (Stoytcheva M., Zlatev R., ed.), kap. 8. InTech, Rijeka, 2013.
9. <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/610.htm>, staženo 7.8.2020.
10. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tebuconazole>, staženo 5.8. 2020.
11. Jakl M., Dytrtova J. J., Cadkova E.: XXXI. *Moderní elektrochemické metody, Jetřichovice, 23-27 květen 2011, Sborník přednášek (Navrátil T., Barek J., ed.) str. 64. Lenka Srsenova-BEST Servis, Ústí nad Labem 2011*
12. Dytrtová J. J., Jakl M., Schröder D., Čadková E., Komárek M.: *Complexation between the fungicide tebuconazole and copper(II) probed by electrospray ionization mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry 25, 1037-1042 (2011).
13. Norková R., Dytrtová J. J., Jakl M., Schröder D.: *Formation of tebuconazole complexes with cadmium (II) investigated by electrospray ionization mass spectrometry*. Water, Air, & Soil Pollution 223, 2633-2640 (2012).
14. Fustinoni S., Mercadante R., Polledri E., Rubino F. M., Mandic-Rajcevic S., Vianello G., Colosio C., Moretto A.: *Biological monitoring of exposure to tebuconazole in winegrowers*. Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology 24, 643-649 (2014).

15. Giavini E., Menegola E.: *Are azole fungicides a teratogenic risk for human conceptus?* Toxicology letters 198, 106-111 (2010).
16. Li S., Wu Q., Sun Q., Coffin S., Gui W., Zhu G.: *Parental exposure to tebuconazole causes thyroid endocrine disruption in zebrafish and developmental toxicity in offspring.* Aquatic Toxicology 211, 116-123 (2019).
17. Zhang H., Qian M., Wang X., Wang X., Xu H., Qi P., Wang Q., Wang M.: *Analysis of Tebuconazole and Tetraconazole Enantiomers by Chiral HPLC-MS/MS and Application to Measure Enantioselective Degradation in Strawberries.* Food Analytical Methods 5, 1342-1348 (2012).
18. https://www.alsglobal.cz/zivotni-prostredi/aktuality/Stanoveni-pesticidu-a-jejich-metabolitu-v-zeminach_1271, staženo 1.8.2020.
19. European Food Safety Authority: *Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance tebuconazole.* EFSA Journal 12, 7 (2014).
20. Navrátil T., Šelešovská R., Krejčová K., Fojta M., Schwarzová K., Janíková L., Chýlková J.: XXXIX. *Moderní elektrochemické metody, Jetřichovice, 20-24 květen 2019.* Sborník přednášek (Navrátil T., Fojta M., Schwarzová K., ed.) str. 201. Lenka Srsenova-BEST Servis, Ústí nad Labem 2019
21. Nováková K., Navrátil T., Dytrtová J. J., Chýlková J.: *Application of copper solid amalgam electrode for determination of fungicide tebuconazole.* International Journal of Electrochemical Science 8, 1-16 (2013).
22. Lović J. D., Mijin D. Ž., Jovanović M. B., Glavaški O. S., Zeremski T. M., Petrović S. D., Ivić M. L. A.: *An investigation of tebuconazole degradation using a gold electrode.* Comptes Rendus Chimie 19, 639-645 (2016).
23. Dytrtová J. J., Fanfrlík J., Norková R., Jakl M., Hobza P.: *Theoretical insight into the stabilization of triazole fungicides via their interactions with dications.* International Journal of Mass Spectrometry 359, 38-43 (2014).
24. Baluchová S., Daňhel A., Dejmková H., Ostatná V., Fojta M., Schwarzová-Pecková K.: *Recent progress in the applications of boron doped diamond electrodes in electroanalysis of organic compounds and biomolecules—a review.* Analytica chimica acta 1077, 30-66 (2019).
25. Fischer J., González-Martín J., Lochyński P., Dejmková H., Schwarzová-Pecková K., Vega M.: *Voltammetric study of triazole antifungal agent terconazole on sp³ and sp² carbon-based electrode materials.* Journal of Electroanalytical Chemistry 863, 114054 (2020).

26. <https://www.metrohm.com/cs-cz/applications/AB-231?fromProductFinder=true>, staženo 4.8.2020.
27. Vitale G., Valina A., Huang H., Amunugama R., Rodgers M.: *Solvation of Copper Ions by Acetonitrile. Structures and Sequential Binding Energies of Cu^+ (CH_3CN) $_x$, $x = 1-5$, from Collision-Induced Dissociation and Theoretical Studies*. The Journal of Physical Chemistry A 105, 11351-11364 (2001).